Vestnik zoologii, **34**(3): 67–72, 2000
© 2000 Т. А. Лукьянченко

УДК 576.895.132 : 599.723+619.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ХИЩНОГО ГРИБА *DUDDINGTONIA FLAGRANS* ДЛЯ СОКРАЩЕНИЯ ЧИСЛЕННОСТИ ИНВАЗИОННЫХ ЛИЧИНОК СТРОНГИЛИД ЛОШАДЕЙ

Т. А. Лукьянченко

Институт зоологии НАН Украины, ул. Б. Хмельницкого 15, Киев-30, ГСП, 01601 Украина

Получено 15 января 1999

Использование хищного гриба *Duddingtonia flagrans* для сокращение численности инвазионных личинок стронгилид лошадей. Лукьянченко Т. А. — Исследована способность хищного гриба *Duddingtonia flagrans* сохранять физиологическую и нематофаговую активность после прохождения через желудочно-кишечный тракт лошади и сокращать численность инвазионных личинок кишечных стронгилид в фекальных культурах. Установлена жизнеспособность хищного гриба при 6-месячном хранении сухого зернового препарата в условиях комнатной температуры и влажности. В фекальных культурах *in vitro* хищный гриб был обнаружен на 2-е сутки после скармливания препарата и определялся в пробах до 7-х суток. Гриб показал высокую нематофаговую активность против инвазионных личинок стронгилид (до 98,6% личинок, погибших на 7-е и 99,9% на 14-е сутки культивирования).

Ключевые слова: *Duddingtonia flagrans*, хищные грибы, стронгилиды, лошади, биологический контроль.

Using of the Predacious Fungus *Duddingtonia flagrans* for Reduction of Numbers of Horse Strongylid Infective Larvae. Lukyanchenko T. A. — The ability of predacious fungus *Duddingtonia flagrans* to survive passage through the digestive tract of horse and subsequently to reduce the number of free-living strongylid larva in the fecal cultures was examined. The fungus has been determined to retain the viability after 6-mounths storage of dry grain preparation at the room temperature and humidity. The predacious fungus was observed in fecal cultures *in vitro* on the 2nd day of experiment and occurred there up to 7th day. It demonstrated high nematophagous activity against infective larvae of horse strongylids: up to 98.6% of larvae eliminated on the 7th day and 99.9% on the 14th day of cultivation.

Key words: *Duddingtonia flagrans*, predacious fungi, Strongylidae, horses, biological control.

Введение

Кишечные стронгилиды (Nematoda: Strongylata) являются наиболее распространенной группой паразитов лошадей. Вызываемые ими заболевания (деляфондиозы, альфортиозы, стронгилезы, трихонематозы) регистрируются во всех регионах Украины и наносят большой экономический ущерб коневодческим хозяйствам.

Современные методы лечения животных химическими препаратами оказались малоэффективными в связи с возникновением резистентных к традиционным антигельминтикам рас паразитических нематод и высокой экзотоксичностью новых препаратов. В настоящее время все большую популярность во всем мире приобретают биологические методы борьбы с паразитическими организмами с помощью их естественных врагов (бактерий, грибов, хищных насекомых и др.) (Poulin, 1998). Наиболее перспективным агентом для биологического контроля паразитических личинок зоонематод являются хищные почвенные грибы (Hyphomycetales), изученных достаточно полно для того, чтобы ее можно было использовать практически, в том числе и в качестве агента биологической борьбы.

Нематофаговые хищные грибы (Hyphomycetales) являются одним из важных компонентов почвенных и фекальных субстратов пастбищного биоценоза. Они выделяются как из почв (Воронин, 1869; Даддингтон, 1959; Сопрунов, 1958), так и из навоза различных травоядных (Zopf, 1888; Duddington, 1951; Juniper, 1957; Larsen et al., 1994), однако методики их выделения достаточно сложны и разнообразны (Мехтиева, 1979). На Украине специальное изучение этой группы грибов не проводилось. Отрывочные данные по хищным гифомицетам встречаются только в статьях по почвенным грибам (Борисова, 1984; Кириленко, 1984).

Вопрос об использовании хищных гифомицетов для борьбы с паразитозами животных обсуждался на протяжении 60 лет (Roubaud and Deschiens, 1939 (цит. по Сопрунову, 1958); Сопрунов, 1958; Корниенко и др., 1956; Тендетник, 1957; Шагалин, 1960; Waller, 1993; Herd, 1994; Nansen et al., 1995; Larsen et al., 1991, 1995, 1997). При этом разрабатывались 2 основные стратегии применения хищных грибов: прямое внесение



Рис. 1. Инвазионная личинка стронгилид, пойманная хищным грибом *Duddingtonia flagrans* (увеличение×600).

Fig. 1. Strongylid infectiv larva trapped by *Duddingtonia flagrans* predacious fungus (magnification×600).

грибной биомассы в субстрат (почва на пастбище и в загонах, подстилка в стойлах) и скармливание ее животным. Первая из них оказалась технически и экономически невыгодной из-за необходимости обработки больших площадей при пастбищном содержании животных (Прядко, 1990). Стратегия же скармливания обеспечивает непосредственное попадание грибных элементов (хламидоспор и конидий) в навозный субстрат, где происходит развитие инвазионных личинок стронгилид.

Попытки скармливать грибной препарат животным предпринимались неоднократно (Roubaud, Deschiens, 1941 (цит. по Сопрунову, 1958); Тендетник, 1957; Сопрунов, 1958; Шагалин, 1960; Прядко, Дробищенко, 1967). Однако до конца 80-х годов исследования в этой области не дали сколько-нибудь существенных для практического применения результатов, так как они велись с видами рода *Arthrobotrys* Corda, производящими большое количество тонкостенных конидий, чувствительных к воздействию ферментов желудочно-кишечного тракта травоядных животных. Начиная с 1991 г., в Датском Центре экспериментальной паразитологии (Копенгаген) ведутся исследования с использованием штаммов *Duddingtonia flagrans* (Duddington) Cooke, выделенного из овечьих фекалий в Австралии (Larsen et al., 1994). Эти штаммы помимо высокой нематофаговой активности (рис. 1), производят в культуре большое количество толстостенных красновато-бурых хламидоспор, которые обладают устойчивостью к процессам переваривания в желудочно-кишечном тракте травоядных (Larsen et al., 1995).

Цель нашей работы — исследование способности хищного почвенного гриба *D. flagrans* сокращать численность инвазионных личинок стронгилид в фекальных культурах после прохождения через желудочно-кишечный тракт лошади и обоснование необходимости проведения дальнейших исследований в области использования хищных грибов против зоонематод на Украине.

Материал и методы

В опытах была использована смесь штаммов (1:1) *Duddingtonia flagrans* Cooke, полученных из Датского Центра экспериментальной паразитологии (штаммы CBS 589.91 и CBS 561.92). Грибная биомасса выращивалась на влажном стерилизованном зерне ячменя в течение 2 недель при температуре 26°C (по Гулий, 1985). Она содержала преимущественно толстостенные окрашенные в бурый цвет хламидоспоры и менее 5% конидий и мицелия. Титр полученного препарата определялся после смыва зерна водопроводной водой 10-минутным встряхиванием в титровальной колбе и составлял $1{,}3\times10^7$ колониеобразующих единиц (КОЕ) на грамм. Во втором опыте сухой зерновой препарат использовался после 6-месячного хранения в стерильных бумажных пакетах в условиях комнатной температуры (t°=20–28°C) и влажности.

Исследования проводились на базе кафедры коневодства Национального аграрного университета и на Киевском ипподроме. В опытах было использовано 4 лошади (по 2 на каждый опыт) с естественным уровнем зараженности стронгилидами. Во время исследований лошади находились на конюшенном содержании

в отдельных денниках. В первом эксперименте были использованы 2 клиппер-пони массой 226 кг и 240 кг, во втором — 2 рысистые кобылы Дубровского конезавода массой 356 кг и 332 кг.

Каждому животному в начале эксперимента было скормлено по 500 г сухого зернового препарата, что составляло $6{,}5\times10^9$ КОЕ. Пробы фекалий отбирались один раз в сутки (в 8 час утра) от каждой лошади. В первом эксперименте каждая проба высевалась на чашки Петри со средой Чапека (по 3 повторности на чашку) и исследовалась на наличие конидий и/или хламидоспор гриба. Во втором эксперименте в каждой фекальной пробе определялось количество яиц стронгилид в 1 грамме флотационным методом. Часть фекальной пробы высевалась на чашки Петри на непитательную агаровую среду (0,25% водный агар) для определения прохождения хищного гриба по методу Сопрунова (Сопрунов, 1958). Для определения эффективности грибного биопрепарата 40 г фекальной массы смешивались с 8 мл водопроводной воды и помещались в стеклянной посуде в термостат (t=22°C) с периодической аэрацией для культивирования инвазионных личинок (Трач, 1992). После инкубации на 7-е и 14-е сутки из фекальных культур отбирались пробы для определения количества инвазионных личинок по методу Бермана. Контролем в опыте служили пробы фекалий от тех же лошадей, взятые за 1 сутки до начала опыта, а также на 15, 16 и 17-е сутки опыта. Количественный учет конидий и хламидоспор гриба в фекальных культурах не проводился.

Результаты

Установлено, что максимальное снижение количества инвазионных личинок в фекальных культурах наблюдается на 2-е и 3-е сутки (лошадь “Азбука”) или на 2-е сутки (лошадь “Косичка”) после скармливания сухого зернового препарата *D. flagrans* лошадям и составляет, соответственно, 99,9% и 99,6% числа выделяемых в навозе яиц стронгилид (табл. 1 и 2). Динамика изменения количества инвазионных личинок в культурах приведена на рисунке 2.

Исследована динамика выхода грибного материала из кишечника экспериментальных лошадей (табл. 3). Первые признаки наличия хищных грибов в навозе отмечаются на 2-е сутки после скармливания биомассы, а выход грибных элементов продолжается до 6–7 сутки от начала эксперимента.

Установлено, что после длительного 6-месячного хранения сухой зерновой препарат хищного гриба *D. flagrans* не теряет жизнеспособности и нематофаговой активности.

Обсуждение

Анализ динамики выделения грибов из кишечника лошади позволяет разрабатывать возможные схемы применения хищных грибов с учетом максимальной эффективности их действия в фекальном субстрате на пастбище. Результаты наших исследований показывают, что эффективность воздействия грибных агентов на инвазион-

Таблица 1. Выживаемость инвазионных личинок стронгилид в пробах от лошади “Азбука”, % от EPG

Table 1. The surviving of infection strongylide larva in fecal samples from "Azbuka" horse, % from EPG

День культивирования пробы	День опыта										
	0	1	2	3	4	5	6	7	15	16	17
7	74,63	73,31	1,37	2,47	8,97	26,12	59,62	72,06	92,27	75,65	96,19
14	79,45	43,61	0,11	0,11	2,10	2,98	6,52	46,03	92,38	96,15	94,35

Таблица 2. Выживаемость инвазионных личинок в пробах от лошади “Косичка”, % от EPG

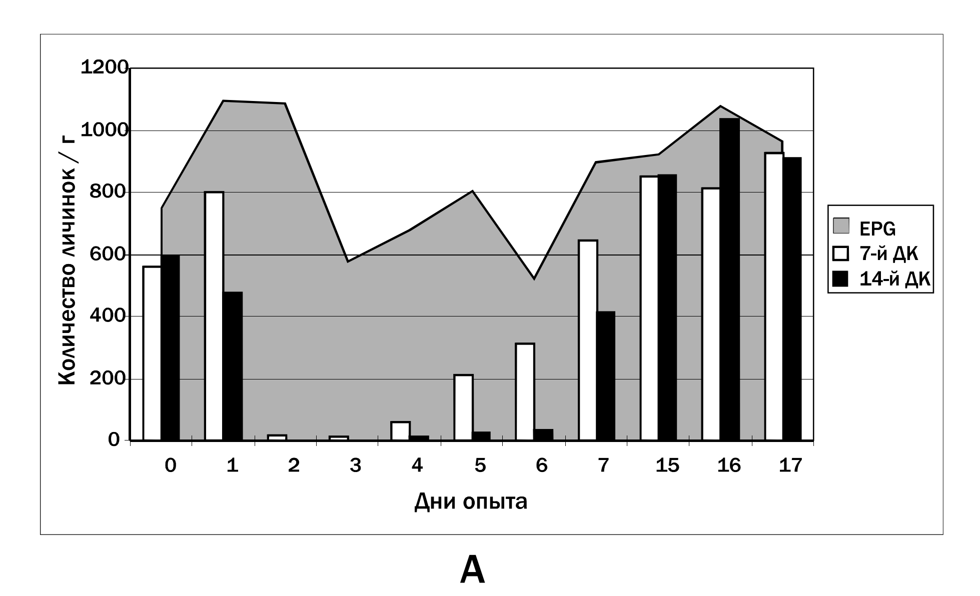
Table 2. The surviving of infection strongylide larva in fecal samples from "Kosichka" horse, % from EPG

День культивирования пробы	День опыта										
	0	1	2	3	4	5	6	7	15	16	17
7	47,84	64,70	1,89	4,10	6,11	23,38	47,05	76,43	95,57	74,53	94,58
14	57,15	34,06	0,47	2,94	2,71	7,43	20,41	53,59	85,78	86,64	75,16

Таблица 3. Динамика выделения хищных грибов из кишечника лошадей

Table 3. The dynamic of excretion of predacious fungi from intestine of horse

Лошадь	День опыта								
	0	1	2	3	4	5	6	7	8
№1 (226кг)	––––	––––	++–	+++	+++	++––	+–––	+–––	––––
№2 (240кг)	––––	––––	+–––	+++	++–	+–––	+–––	––––	––––



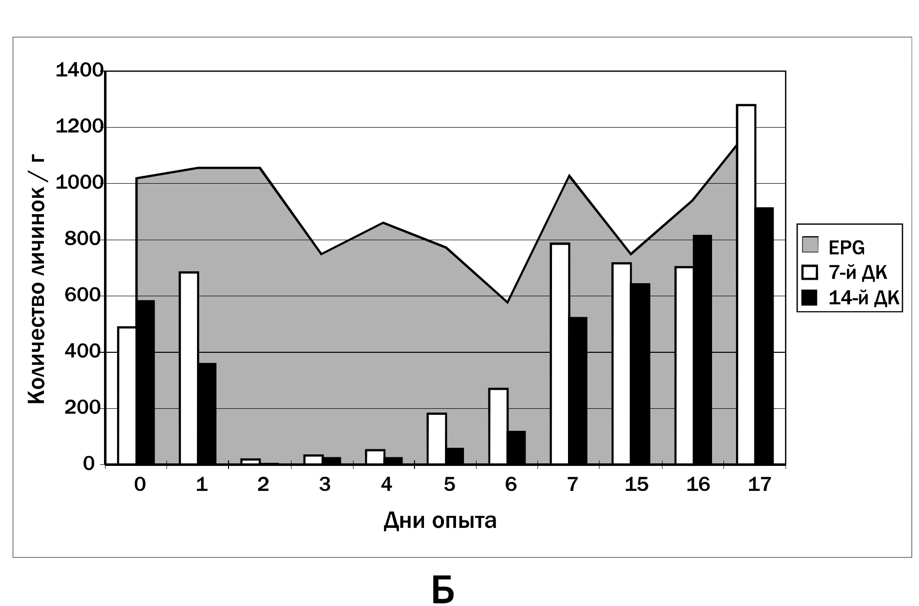


Рис. 2. Количество инвазионных личинок стронгилид в культурах. А — лошадь "Азбука"; Б — лошадь "Косичка"; EPG — количество яиц стронгилид в 1 г исследуемого навоза; ДК — день культивирования пробы.

Fig. 2. Number of infection larva of strongylids in cultures. A — "Azbuka" horse; B — "Kosichka" horse; EPG — number of strongylid eggs per 1 g of feces studied; ДК — day of cultivation of the sample.

ных личинок в навозе будет существенно снижаться на 5-е сутки после скармливания препарата в соответствии с уменьшением количества выделяемых грибных единиц. Начиная с 7-х суток после скармливания выделение грибов в навозе прекращается. Следовательно, для эффективного применения хищных грибов против инвазионных личинок на пастбище необходимы частые повторные скармливания грибного биопрепарата через каждые 4—5 суток для поддержания достаточно высокого количества грибных единиц в выделяемом навозе.

Установленное в наших исследованиях сохранение жизнеспособности штаммов *D. flagrans* при 6-месячном хранении сухого зернового препарата согласуется с данными, полученными при работе со штаммами *Arthrobotrys oligospora* (Шагалин, 1971). Это позволяет предположить возможность разработки технологических схем исполь-

зования зерновых препаратов *D. flagrans* при интегрированных методах контроля нематодозов лошадей в коневодческих хозяйствах.

Эксперимент по исследованию нематофаговой активности *D. flagrans* против инвазионных личинок стронгилид в навозных культурах показал высокую эффективность применения его сухого зернового препарата для сокращения численности инвазионных личинок в условиях лабораторного культивирования. Однако для оценки его эффективности при пастбищном содержании лошадей в степной зоне Украины требуется проведение полевых экспериментов в условиях колебаний температуры и влажности.

Выводы

Выявлена высокая эффективность исследованных штаммов *D. flagrans* против инвазионных личинок лошадиных стронгилид в фекальных культурах *in vitro*, которая в максимуме составляла 99,9% и 99,6% погибших личинок относительно числа выделяемых яиц стронгилид у двух лошадей на 2–3 сутки опыта. Установлено, что 6-месячное хранение сухого зернового препарата *D. flagrans* на ячмене в условиях комнатной температуры и влажности не оказывает заметного влияния на жизнеспособность хламидоспор и его нематофаговую активность. Указана необходимость проведения широких полевых экспериментов по выяснению влияния природных условий в разные сезоны года на эффективность применения сухих препаратов хищных грибов.

Благодарности

Выражаю благодарность доктору М. Ларсену (Дания) за любезно предоставленные для изучения штаммы *D. flagrans*, Б. А. Борисову за помощь в наращивании сухого зернового препарата для проведенных опытов, Э. З. Коваль за помощь в определении хищных грибов на агаровых средах, Г. М. Двойносу за критические замечания в первоначальных вариантах рукописи, Ю. И. Кузьмину за помощь в обработке данных по опытам.

Борисова В. Н. Гифомицеты лиственного опада // Микромицеты почв. — К. : Наук. думка, 1984. — С. 155–180.

Воронин М. С. Микологические исследования. — С.-Пб., 1869. (цит. по Сопрунову, 1958).

Даддингтон К. А. Хищные грибы — друзья человека. — М. : Иностр. лит-ра, 1959. — 188 с.

Кириленко Т. С. Микромицеты почв под посевами ячменя и овса // Микромицеты почв. — К. : Наук. думка, 1984. — С. 47–84.

Корниенко З. П., Тендентник Ю. Я., Чарыев О. Ч. О применении хищного гриба для обеззараживания конского навоза от личинок стронгилид // Ветеринария. — 1956. — № 11. — С. 74–82.

Культивирование и применение грибов против вредителей и болезней в защищенном грунте / Под ред. В. В. Гулия. — Кишинев : ВНИИ БМСР, 1985. — 88 с.

Мехтиева Н. А. Хищные нематофаговые грибы–гифомицеты. — Баку : Элм, 1979. — 244 с.

Прядко Э. И. Грибы–гифомицеты — регуляторы численности паразитических нематод. — Алма-Ата : Наука, 1990. — 176 с.

Прядко Э. И., Дробищенко Н. И. К применению биометода для профилактики гельминтозов. // Изв. АН КазССР. Сер. биол. — Алма-Ата, 1967. — № 1.— С. 44–48.

Сопрунов Ф. Ф. Хищные грибы — гифомицеты и их применение в борьбе с патогенными нематодами. — Ашхабад : Изд-во АН ТССР, 1958. — 366 с.

Тендетник Ю. Я. Экспериментальная разработка биологического метода борьбы с патогенными нематодами : Автореф. дис. ... канд. биол. наук. — Ашхабад, 1957. — 19 с.

Трач В. Н. Рекомендации по применению нового метода учета яиц гельминтов и цист простейших в фекалиях животных. — Киев : Наук. думка, 1992. — 14 с.

Шагалин С. Ф. Уничтожение личинок подотряда Strongylata хищными грибами Arthrobotrys oligospora Fresenius и Arthrobotrys arthrobotryoides v. indolens в фекалиях лошади // Тр. Ин-та зоологии и паразитологии АН ТуркмССР. — 1960. — **5**. — С. 232–237.

Шагалин С. Ф. Методы работы с хищными грибами (гифомицетами). — Ашхабад : Изд-во АН ТССР, 1971. — 21 с.

Cooke R. C., Godfrey B. E. S. A key to the nematode-destroying fungi // Trans. Br. Mycol. Soc. — 1964. — № 47. — P. 61–74.

Duddingtonn C. L. The ecology of predacious fungi. I. Preliminory survey // Trans. Br. Mycol. Soc. — 1951. — № 34. — P. 322—331.
Gray N. F. Ecology of nematophagous fungi: distribution and habitat // Ann. Appl. Biol. — 1983. — № 102. — P. 501—509.
Herd R. P. Nematophagous Fungi for the Control of Equine Cyathostomes // Equine. Comp. — 1994. — **16**. — № 5. — P. 658—665.
Juniper A. J. Dung as a sourse of predacious fungi // Trans. Br. Mycol. Soc. — 1957. — **40**. — P. 346—348.
Larsen M., Wolstrup J., Henriksen S. A. et al. In vitro stress selection of nematophagous fungi for biocontrol of parasitic nematodes in ruminants // J. Helmintol. — 1991. — **65**. — P. 193—200.
Larsen M., Faedo M., Waller P. J. The potential of nematophagous fungi to control the free-living stages of nematode parasites of sheep: Survey for the presence of fungi in fresh feaces of grazing livestock in Australia // Vet. Parasitol. — 1994. — **53**. — P. 275—281.
Larsen M., Nansen P., Henriksen S. A. et al. Predacious activity of the nematode-trapping fungus Duddingtonia flagrans against cyathostome larvae in faeces after passage through the gastro-intestinal tract of horses // Vet. Parasitol. — 1995. —**57**. — P. 1—6.
Larsen M., Nansen P., Gronvold J. et al. Biological control of gastro-intestinal nematodes: facts, future of fiction? // Vet. Parasitol. — 1997. — **72**. — P. 479—492.
Nansen P., Larsen M., Gronvold J. et al. Prevention of clinical trichostrongylidosis in calves by strategic feeding with the predacious fungus Duddingtonia flagrans // Parasitol. Res. — 1995. — **81**. — P. 371—374.
Poulin R. Evolutionary ecology of parasites. From individuals to communities. — London : Chapman and Hall. — 1998. — 212 p.
Waller P. J. Towards sustainable nematode parasite control of livestock // Vet. Parasitol. — 1993. — **48**. — P. 295—309.
Zopf W. Zur Kenntnis der Infections Krankheiten niederer Thiere und Pflanzen // Nova Acta Leopold Carol. — 1888. — **52**. — P. 314—376.